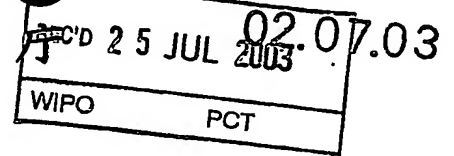


ec'd PCT/PTO 03 JAN 2005

PCT/JP 03/08420

日本国特許
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2002年 7月 3日

出願番号
Application Number:

特願2002-194491

[ST.10/C]:

[JP2002-194491]

出願人
Applicant(s):

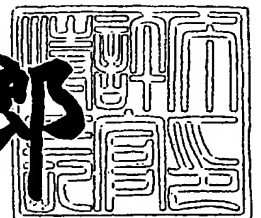
小野薬品工業株式会社
本庶 佑

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3041914

【書類名】 特許願
 【整理番号】 ONP4226
 【提出日】 平成14年 7月 3日
 【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿
 【国際特許分類】 A61P 31/00
 A61P 35/00
 A61P 37/00

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区岩倉大鷲町 1 9 - 4

【氏名】 本庶 佑

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区高野上竹屋町 1 0 - 3 6

【氏名】 湊 長博

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市上京区上生洲町 2 0 1 - 4 0 3

【氏名】 岩井 佳子

【特許出願人】

【識別番号】 000185983

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 1 番 5 号

【氏名又は名称】 小野薬品工業株式会社

【代表者】 松本 公一郎

【特許出願人】

【識別番号】 396023812

【住所又は居所】 京都府京都市左京区岩倉大鷲町 1 9 - 4

【氏名又は名称】 本庶 佑

【代理人】

【識別番号】 100081086

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町 2 丁目 2 番 6 号 堀口第 2 ビ
 ル 7 階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 大家 邦久

【電話番号】 03(3669)7714

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 043731

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710265

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 癌もしくは慢性感染症治療のための免疫賦活剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 PD-1またはPD-L1によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害する免疫賦活剤。

【請求項2】 PD-1とPD-L1との相互作用を選択的に阻害する活性を有する請求項1に記載の免疫賦活剤。

【請求項3】 PD-1またはPD-L1に結合して、その機能を阻害する活性を有する請求項1に記載の免疫賦活剤。

【請求項4】 PD-1の細胞内ドメインからの抑制シグナルを阻害する活性を有する請求項1に記載の免疫賦活剤。

【請求項5】 PD-1またはPD-L1の産生を阻害する活性を有する請求項1に記載の免疫賦活剤。

【請求項6】 請求項2または3に記載の阻害様式を有するPD-1またはPD-L1に対する抗体を有効成分とする免疫賦活剤。

【請求項7】 請求項2乃至5のいずれかに記載の阻害様式を有する、ポリペプチドまたはその誘導体、有機合成化合物、天然物、およびポリヌクレオチドから選択される少なくともひとつを有効成分とする免疫賦活剤。

【請求項8】 請求項6または7に記載の免疫賦活剤を有効成分とする抗癌作用を有する癌の免疫療法剤。

【請求項9】 請求項6または7に記載の免疫賦活剤を有効成分とする慢性感染症治療に有効な感染症治療剤。

【請求項10】 PD-L1を発現する細胞を用いて、請求項2乃至5のいずれかに記載の阻害活性を評価し、癌もしくは慢性感染症の治療剤候補を選別することを特徴とするインビトロスクリーニング方法。

【請求項11】 請求項10記載のスクリーニング方法で使用する細胞株であって、PD-L1を安定に発現するように形質転換された腫瘍細胞株。

【請求項12】 PD-L1を発現する腫瘍細胞を移植し、請求項2乃至5のいずれかに記載の阻害活性を評価して癌の治療剤を選別することを特徴とする

インビボ評価法。

【請求項 1 3】 請求項 1 2 のインビボ評価法に用いられる、PD-L1 を発現する腫瘍細胞を移植された腫瘍移植マウス。

【請求項 1 4】 請求項 8 記載の癌の免疫療法剤と、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、P 糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、その他免疫療法剤およびその他抗癌剤から選択されるいずれか 1 つもしくは 2 つ以上のものとの組み合わせからなる癌治療のための医薬組成物。

【請求項 1 5】 請求項 8 記載の癌の免疫療法剤と、白血球（好中球）減少症治療薬、血小板減少症治療薬、制吐剤および癌性疼痛治療薬から選択されるいずれか 1 つもしくは 2 つ以上のものとの組み合わせからなる癌治療補助のための医薬組成物。

【請求項 1 6】 請求項 9 記載の感染症治療剤と、抗 HIV 剤、抗ウイルス剤、抗生物質製剤、抗菌剤および内臓真菌症治療薬から選択されるいずれか 1 つもしくは 2 つ以上のものとの組み合わせからなる感染症治療のための医薬組成物。

【請求項 1 7】 体外で PD-1 の発現を阻害する遺伝子操作を施し、さらに増殖および分化させ、腫瘍、ウイルスまたは病原体に対する免疫反応を活性化させた患者由来のリンパ球細胞。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、PD-1 または PD-L1 によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害することを特徴とする薬剤の癌もしくは慢性感染症の免疫療法における新たな使用方法に関する。

さらに詳しく言えば、PD-1 または PD-L1 によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害する免疫賦活剤、その免疫賦活剤を有効成分とする免疫療法剤、感染症治療剤、癌もしくは慢性感染症治療剤のインビトロスクリーニング方法、

前記方法に使用される腫瘍細胞株、癌の治療剤を選別するインビボ評価法、その評価に用いられる腫瘍移植マウス、癌治療のための医薬組成物、感染症治療のための医薬組成物、および免疫反応を活性化させたリンパ球細胞に関する。

【0002】

【発明の背景】

免疫療法は、ほとんどの薬物療法において不可避な副作用が少なく、極めて特異性の高い治療方法であると期待されている。特に、癌治療や慢性感染症治療における薬物療法が、患者に対して大きな負担を課す治療方法であるために、患者のQOL（クオリティ・オブ・ライフ）の回復が重要視されているが、免疫療法は、ヒトがもともと備えている免疫反応を外因的な方法によって賦活化させ、薬物投与による負担の一部を肩代わりさせることによって、患者のQOLを回復させる目的のもとに行うことができる。

【0003】

免疫の賦活化は、Tリンパ球細胞の免疫反応を活性化させる方法で行うことができる。T細胞の活性化には、抗原レセプター（TCR）を介した刺激だけでなく、共役刺激分子群（例えばCD28）を介した付加的な刺激誘導が必要であるといわれている。一方、最近、共役刺激分子群と相同的な構造を有する分子群、CTLA-4とPD-1が発見され、抗原レセプター（TCR）シグナルを抑制するシグナルを発していることが報告されている。T細胞の活性化の方法として、この共役抑制分子の機能を抑制することも有効な1つの手段であると考えられている。

【0004】

PD-1は免疫グロブリンファミリーに属する55kDのI型膜タンパクとしてクローニングされ（The EMBO J., vol11, No.11, 3887~3895 (1992)；特開平5-336973号；EMBL/GenBank Acc. No.X67914；特開平7-291996号）、その発現は、胸腺細胞においてはCD4-CD8-からCD4+CD8+細胞に分化する際に認められる（Int Immunol., Vol8, No.5, 773-780 (1996)；J. Exp. Med., Vol191, No.5, 891-898 (2000)）。また、末梢におけるPD-1の発現は、抗原レセプターからの刺激により活性化したT細胞、B細胞（Int Immunol., Vol8

, NO.5, 765-772 (1996)) および活性化マクロファージを含む骨髄細胞に認められることが報告されている。PD-1の細胞内領域には、ITIMモチーフ (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) があり、免疫反応に対する抑制ドメインと考えられている。さらに、PD-1欠損マウスが、糸球体腎炎、関節炎といったループス様自己免疫病 (C57BL/6遺伝子背景) (Int. Immunol., Vol10, No.10, 1563~1572 (1998); Immunity., Vol11, No.2, 141-151 (1999)) や拡張性心筋症様疾患 (BALB/c遺伝子背景) (Science., Vol291, No.5502, 319-332 (2001)) を発症することから、PD-1が自己免疫疾患発症の、特に末梢自己免疫寛容の制御因子であることも示唆されている。

【0005】

PD-1のリガンドであるPD-L1 (EMBL/GenBank Acc. No. AF233516) は、活性化した単球や樹状細胞などのいわゆる抗原提示細胞に発現している (J. Exp. Med., Vol19, No.7, 1027-1034 (2000))。これら細胞は、Tリンパ球細胞に対して、さまざまな免疫誘導シグナルを誘導する相互作用分子を提示しており、PD-L1は、PD-1による抑制シグナルを誘導する分子の1つである。PD-L1リガンド刺激は、PD-1を発現しているTリンパ球細胞の活性化 (細胞増殖、各種サイトカイン産生誘導) を抑制することが示されている。さらに、PD-L1の発現は、免疫担当細胞のみでなく、ある種の腫瘍細胞株 (単球性白血病由来細胞株、肥満細胞種由来細胞株、肝癌由来細胞株、神経芽細胞種由来細胞株、乳癌由来各種細胞株) でも確認されている (Nature Immunol. Vol12. No. 3, 261-267 (2001))。

【0006】

PD-1に代表される共役抑制分子からの抑制シグナルは、抗原レセプター (TCR) および共役刺激分子によるポジティブなシグナルを適性に制御するメカニズムによって、リンパ球発生ならびに成熟過程での免疫寛容や自己抗原に対する異常な免疫反応を制御していると考えられている。また、ある種の腫瘍やウイルスは、直接的もしくは間接的なメカニズムによって、T細胞の活性化および増殖を遮断し、これら共役抑制分子を自らに対する宿主免疫反応を衰弱させるのに利用していると考えられている (Cell., Vol71, No.7, 1093-1102 (1992); Sci

ence, Vol259, No.5093, 368-370 (1993))。

【0007】

さらに、T細胞の機能障害に起因すると考えられている疾患の一部では、これら共役抑制分子の異常がT細胞の機能障害を起していると考えられている。これらのことから、癌または慢性感染症もしくはT細胞機能障害に起因する疾患の治療において、これら共役抑制分子の制御によるTリンパ球細胞性免疫反応の活性化を利用することができる。

【0008】

【発明が解決するための課題】

本発明者らは、癌もしくは慢性感染症の免疫療法における新たな標的として、PD-1およびPD-L1に注目した。本発明の課題は、PD-1またはPD-L1の機能を阻害することを特徴とする癌もしくは慢性感染症の治療剤の提供にある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、PD-L1を発現している腫瘍細胞を用いた腫瘍移植マウスを用いて、PD-1あるいはPD-L1の機能を阻害する治療剤の投与が、癌治療に有効であるか否かを検討した。その結果、PD-1またはPD-L1の機能を阻害する薬剤が、癌もしくは慢性感染症に対して新たな治療効果を有することを見出し本発明を完成した。

【0010】

【発明の構成】

すなわち、本発明は以下の免疫賦活剤、免疫療法剤、感染症治療剤、インビトロスクリーニング方法、腫瘍細胞株、癌の治療剤を選別するインビボ評価法、その評価に用いられる腫瘍移植マウス、癌治療のための医薬組成物、感染症治療のための医薬組成物、および免疫反応を活性化させたリンパ球細胞に関するものである。

【0011】

1. PD-1またはPD-L1によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害する

免疫賦活剤。

2. PD-1とPD-L1との相互作用を選択的に阻害する活性を有する前項1に記載の免疫賦活剤。

3. PD-1またはPD-L1に結合して、その機能を阻害する活性を有する前項1に記載の免疫賦活剤。

【0012】

4. PD-1の細胞内ドメインからの抑制シグナルを阻害する活性を有する前項1に記載の免疫賦活剤。

5. PD-1またはPD-L1の産生を阻害する活性を有する前項1に記載の免疫賦活剤。

6. 前項2または3に記載の阻害様式を有するPD-1またはPD-L1に対する抗体を有効成分とする免疫賦活剤。

【0013】

7. 前項2乃至5のいずれかに記載の阻害様式を有する、ポリペプチドまたはその誘導体、有機合成化合物、天然物、およびポリヌクレオチドから選択される少なくともひとつを有効成分とする免疫賦活剤。

8. 前項6または7に記載の免疫賦活剤を有効成分とする抗癌作用を有する癌の免疫療法剤。

9. 前項6または7に記載の免疫賦活剤を有効成分とする慢性感染症治療に有効な感染症治療剤。

【0014】

10. PD-L1を発現する細胞を用いて、前項2乃至5のいずれかに記載の阻害活性を評価し、癌もしくは慢性感染症の治療剤候補を選別することを特徴とするインビトロスクリーニング方法。

11. 前項10記載のスクリーニング方法で使用する細胞株であって、PD-L1を安定に発現するように形質転換された腫瘍細胞株。

12. PD-L1を発現する腫瘍細胞を移植し、前項2乃至5のいずれかに記載の阻害活性を評価して癌の治療剤を選別することを特徴とするインビボ評価法。

【0015】

13. 前項12のインビボ評価法に用いられる、PD-L1を発現する腫瘍細胞を移植された腫瘍移植マウス。

14. 前項8記載の癌の免疫療法剤と、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、その他免疫療法剤およびその他抗癌剤から選択されるいずれか1つもしくは2つ以上のものとの組み合わせからなる癌治療のための医薬組成物。

15. 前項8記載の癌の免疫療法剤と、白血球（好中球）減少症治療薬、血小板減少症治療薬、制吐剤および癌性疼痛治療薬から選択されるいずれか1つもしくは2つ以上のものとの組み合わせからなる癌治療補助のための医薬組成物。

【0016】

16. 前項9記載の感染症治療剤と、抗HIV剤、抗ウイルス剤、抗生物質製剤、抗菌剤および内臓真菌症治療薬から選択されるいずれか1つもしくは2つ以上のものとの組み合わせからなる感染症治療のための医薬組成物。

17. 体外でPD-1の発現を阻害する遺伝子操作を施し、さらに増殖および分化させ、腫瘍、ウイルスまたは病原体に対する免疫反応を活性化させた患者由来のリンパ球細胞。

【0017】

本発明は、PD-1またはPD-L1によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害することを特徴とする薬剤が、癌もしくは慢性感染症の治療に有効に使用できることを示すとともに、その治療剤を提供するものである。

【0018】

本発明の薬剤は、PD-1またはPD-L1に結合してその機能を阻害するもの、あるいはPD-1とPD-L1との相互作用を阻害するもの、またはPD-1の細胞内ドメインであるITIMドメインから発せられる抑制シグナルを直接的あるいは間接的に阻害するものを含む。さらに、PD-1もしくはPD-L1分子自身の産生を阻害するものも含む。

【0019】

PD-1またはPD-L1に結合して機能を阻害する、あるいはPD-1とP

D-L1の相互作用を阻害する薬剤、いわゆるPD-1あるいはPD-L1阻害剤としては、抗体、ポリペプチドまたはその誘導体、有機合成化合物、天然物などが挙げられる。特に、特異性に優れた薬剤として抗体が好適である。

【0020】

本発明で使用する抗体は、PD-1とPD-L1の結合によって誘導される抑制シグナルを阻害する活性を有する抗体であれば、ポリクローナルまたはモノクローナルもしくは完全型または短縮型（例えばF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv）、ヒト化抗体、キメラ化抗体のいずれのものでもよい。

【0021】

そのような抗体は、ヒトPD-1またはヒトPD-L1の細胞外領域の部分タンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。細胞外領域の部分タンパク質は、公知のタンパク質発現ならびに精製法によって調製することができる。

【0022】

ポリクローナル抗体は、公知の方法によって製造することができる。例えば、抗原タンパク質、あるいはそれとキャリアー蛋白質との混合物で、適当な動物に免疫を行ない、その免疫動物から抗原タンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。用いられる動物としては、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、モルモットが一般的に挙げられる。抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを抗原タンパク質と共に投与することができる。投与は、通常約2週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうのが一般的である。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された動物の血液、腹水などから採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、ELISA法によって測定することができる。ポリクローナル抗体の分離精製は、例えば、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤を用いた精製法、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法などの免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0023】

抗体製剤としては、モノクローナル抗体あるいはその修飾体がより好ましい。

モノクローナル抗体産生細胞の作製は、抗原で免疫された動物から抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、継代培養可能なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製することにより行うことができる。抗原タンパク質の投与は、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に行う。投与には、抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与するのが一般的である。また、“DNA免疫”と呼ばれる方法によっても、動物を免疫することができる。この方法は、免疫動物の後足前脛骨筋にCardiotoxin（蛇毒）を処置し、さらに抗原タンパク質を発現するベクターを導入した後、組織修復の過程でベクターが筋細胞に取りこまれ、タンパク質を発現する現象を利用した方法である（Nature Immunol. Vol.12. No.3, 261-267 (2001)）。

【0024】

免疫される動物としては、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、モルモットが可能であるが、マウスおよびラットが主に用いられる。融合操作は、KohlerとMilsteinの方法（Nature., 256, 495- (1975)）で実施することができ、融合促進剤としては、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどが用いられる。骨髓腫細胞としては、P3U1、NS1、SP2/O、AP1などの骨髓腫細胞が挙げられるが、通常P3U1がよく利用される。モノクローナル抗体産生細胞の選別は、例えば、抗原タンパク質を直接あるいは担体と共に吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加することによるELISA法などにより検出して行うことができる。さらに、ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、ELISA法によって測定できる。モノクローナル抗体の分離精製は、上記のポリクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0025】

F(ab')₂、Fab'、Fab抗体フラグメントは、プロテアーゼ酵素により

処理し、場合により還元して得ることができる。

【0026】

F (a b')₂抗体フラグメントは、精製されたモノクローナル抗体をペプシンで完全に消化し、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、プロテインAあるいはプロテインGカラムなどのアフィニティークロマトグラフィーのいずれかの方法により精製することができる。ペプシンの消化時間は、Igサブタイプにより異なるため、適当に調製することが必要である。F a b'抗体フラグメントは、調製したF (a b')₂を2-メルカプトエチルアミンで部分還元することによって作製することができる。また、F a b抗体フラグメントは、システイン存在下で消化酵素パインで直接消化し、精製して作製することができる。

【0027】

また、モノクローナル抗体は、抗体のアミノ酸配列を決定したり、ハイブリドーマから抗体をコードするDNA配列を利用して、遺伝子組換え技術により改良し、改変抗体やハイブリッド抗体を産生させることも可能である。例えば、通常の完全型抗体ではなく単鎖抗体として作製することもできる。s c F v抗体 (single chain Fv) は、ジョストらの方法 (J. B. C., 269 : 26267-73 (1994)) により行うことができる。重鎖および軽鎖の可変領域をそれぞれコードするDNA断片を中性アミノ酸 (グリシンあるいはセリン) をコードするスペーサーで連結し、この融合DNAを含む発現ベクターを適当な宿主細胞で発現させることによって、本来の抗体の特性と親和性を保持する単鎖の抗体を作製することができる。

【0028】

抗体をヒトの治療に用いる場合、その抗体の抗原性を減少させることが不可欠である。患者の抗体に対する免疫反応は、有効な治療期間を短縮させる場合が多く、抗体をヒト化させ、抗体の抗原性を減らす工程が必要である。

【0029】

ヒトの定常領域をコードする遺伝子とのキメラを構築することによって、ヒト化抗体を作製できることが知られている (P. N. A. S., 84 : 3439 (1987) ; J Immunol. 139:3521 (1987))。ヒトの定常領域のDNA配列は文献に記載されて

おり、その定常領域遺伝子は既知のクローンから容易に入手できる。続いて、抗体の可変領域をコードするDNA配列をヒトの定常領域の配列に融合させる。ヒトの定常領域のアイソタイプは所望のエフェクター機能または抗体依存細胞性細胞毒性における活性によって選択できる。好ましいアイソタイプはIgG1、IgG3およびIgG4である。また、ヒト軽鎖定常領域、 κ 鎖または λ 鎖のいずれかを用いることができる。このヒト化キメラ抗体は通常の方法によって発現させることができる。

【0030】

ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリンの定常領域遺伝子を導入されたマウスを利用して作製することができ、さらに量産することができる。

【0031】

PD-1またはPD-L1を阻害するポリペプチドもしくはその誘導体としては、PD-1またはPD-L1のそれぞれの部分タンパク質であって、抑制シグナルを誘導しないものが挙げられる。PD-1の抑制シグナル誘導には、PD-1自体が抗原提示された抗原レセプター（TCR）の近傍に存在することが不可欠であり、そのためには抗原提示細胞あるいは腫瘍細胞に存在するPD-L1との相互作用による拘束が必要であると考えられる。したがって、細胞外ドメインのみであってPD-1と相互作用する部分を有する可溶化PD-L1は、PD-1の有効な拮抗物質となり、抑制シグナルを阻害すると考えられる。逆に、同様の構造を有し、PD-L1に相互作用できる可溶化PD-1もまた有効な拮抗物質になり得る。これら可溶化タンパク質は、PD-1あるいはPD-L1に結合するのに必要十分な細胞外領域を含むものであればよく、公知のタンパク質発現ならびに精製法によって調製することができる。

【0032】

PD-1とPD-L1の相互作用に必須の領域が、連続するポリペプチドのみによって構成されている場合、そのようなポリペプチド断片は、互いの拮抗物質になり得る。さらに、このポリペプチド断片を化学的に修飾された、あるいはポリペプチド断片の立体構造をもとにコンピュータによって設計された分子群から、より強力な活性を有する拮抗物質を同定することが可能となる。また、相互作

用領域のタンパク質立体構造解析データをもとにコンピュータによって設計された分子群の中から、拮抗分子をより効率的に選択することもできる。

【0033】

より簡便な方法として、PD-1とPD-L1の相互作用を測定する各種方法によって、その相互作用を阻害する物質を直接スクリーニングすることができる。同様の活性を有する物質は、ペプチド、非ペプチド性化合物、有機合成化合物、発酵生産物、細胞抽出物、植物抽出物、動物組織抽出物などのライブラリーから同定することが可能である。

【0034】

インビトロスクリーニングは、例えば、免疫沈降法、RIA法、EIA法、メンブレインアッセイ法、BIAコア装置を使用したタンパク質相互作用測定法、FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) 原理を利用したタンパク質相互作用測定法、タンパク質アレイを使用したタンパク質相互作用測定法で行うことができる。一方、細胞を使用する測定方法として、PD-1を発現する細胞傷害性Tリンパ球細胞 (CTL) の傷害活性を測定する方法が挙げられる。

【0035】

具体的には、細胞傷害性Tリンパ球の腫瘍細胞に対する傷害活性を測定し、その活性に対する評価薬物の効果を定量するものである。この方法は、PD-1をネイティブに発現している細胞傷害性Tリンパ球細胞 (CTL) 細胞株 (例えば、2C) に、同系マウス由来であってPD-L1をネイティブに発現している、あるいは強制的に発現させた腫瘍細胞を添加し、接触させることによって生じる細胞傷害活性を定量するものである。本法の特徴は、PD-L1を発現していない腫瘍細胞に対する細胞傷害活性に比べ、PD-L1を発現している腫瘍細胞に対する細胞傷害活性が低く、評価薬物による細胞傷害活性の回復 (上昇幅) をより明確に測定できるところにある。評価薬物による細胞傷害性の回復は、本法の特徴とするPD-L1による細胞傷害性の抑制の阻害に相当するものとして評価することができる。さらに、評価薬物による細胞毒性を任意に測定することがより望ましい。使用される腫瘍細胞としては、ネイティブにPD-L1を発現している腫瘍細胞 (例えば、P38D1細胞、P815細胞、NB41A3細胞、M

DA-231細胞、SKBR-3細胞、MCF-7細胞、BT474細胞、J558L細胞、P3U1細胞、PAI細胞、X63細胞、SP2/0細胞) (Nature Immunol. Vol12. No.3, 261-267 (2001)) を用いることができるが、PD-L1を安定的に発現、あるいは誘導発現させるように形質転換させた腫瘍細胞も使用することができる。一方、使用できる細胞傷害性リンパ球は、PD-1を発現しているものであって、腫瘍細胞に対して同系の動物由来の細胞であることが好ましい。

【0036】

さらに、同様の原理を利用したインビゴ評価法は、上記PD-L1発現腫瘍細胞を同系マウスに移植して、移植腫瘍の増殖、各種血中サイトカイン産生量、腫瘍の浸潤ならびに転移の組織学的解析、個体群の延命効果などを評価することができる。本法も、PD-L1発現腫瘍細胞を使用するところに特徴があり、上記インビトロ法と同様の効果を利用したものである。本法における評価薬物による腫瘍の治療効果は、PD-L1による細胞傷害性の抑制の阻害に由来する効果に相当するものとして評価することができる。移植する腫瘍細胞は、インビトロスクリーニング法で使用する腫瘍細胞のいずれをも使用できるが、移植マウスと同系由来のもので、増殖性が良いものがより好ましい。

【0037】

PD-1の細胞内ドメインの抑制シグナルを阻害する薬剤としては、ペプチドもしくはペプチド類縁体、有機合成化合物、天然物が挙げられる。PD-1によるTリンパ球細胞の活性化の抑制は、PD-1の細胞内ドメインであるITIMに結合した脱リン酸化酵素が、抗原レセプター(TCR)の細胞内複合体に接触することによって生じることから、総じて、抗原レセプターとPD-1の接触を阻害するものがこれに相当すると考えられる。よって、抑制シグナルを阻害する薬剤として、ITIMのチロシン残基のリン酸化を阻害するもの、ITIMへの脱リン酸化酵素の結合を阻害するもの、その脱リン酸化酵素の活性を直接阻害するものなどが含まれる。

【0038】

PD-1またはPD-L1の産生を阻害する薬剤としては、ポリヌクレオチド

または有機合成化合物もしくは天然物が挙げられる。特に、好適なポリヌクレオチドとして、リボザイムと呼ばれるアンチセンスヌクレオチド誘導体が挙げられる。これは、PD-1あるいはPD-L1のmRNAに相補的なポリヌクレオチド誘導体を、対応する発現細胞に導入することによって、発現するmRNAが破壊される機構を利用したものである。さらに、ベクターは、患者から採取したリンパ球前駆細胞に対して、PD-1の発現を阻害するような遺伝子治療的操作を施し、成熟化および活性化させて、再び患者に投与する細胞医療に利用することができる。癌に対する免疫療法においては、リンパ球前駆細胞の成熟化および活性化の際に、腫瘍抗原を添加することによって、腫瘍に特異的で、よりクローナルなリンパ球細胞を調製することができる。

【0039】

本発明の薬剤は、PD-1あるいはPD-L1の機能を阻害するものやPD-1の細胞内ドメインであるITIMドメインから発せられる抑制シグナルを直接的あるいは間接的に阻害する活性を有するもの、さらに、PD-1あるいはPD-L1分子自身の産生を阻害する活性を有するものをも含む。癌治療においては、これら阻害活性を有する薬剤は、Tリンパ球細胞の免疫反応を活性化させることによって、抗腫瘍免疫を賦活させることができる。

【0040】

本発明者らは、腫瘍移植動物モデルへの投与によって、腫瘍の増殖を顕著に抑制し個体の延命効果を発揮する薬剤として、PD-L1の機能を阻害する特異的抗体（抗PD-L1抗体）を開発した。この抗体は、PD-1を発現しているCTL（細胞傷害性Tリンパ球細胞）へのPD-L1リガンドの提示によって相対的に低下する細胞傷害活性を回復させる作用を示した（実施例1，図1参照）。これは、CTLによる腫瘍細胞に対する細胞傷害活性が、この抗体の投与によって増強しうることを示唆するものである。さらに、この抗体の投与は、PD-L1を人為的に発現させた肥満細胞腫由来細胞株を移入した同系マウスを用いた腫瘍移植動物モデル（蛋白質・核酸・酵素，26(3)，208，1981.）において、腫瘍増殖や腫瘍細胞の浸潤および転移を抑制し、個体の延命効果を示した（実施例2の図2、実施例3の図3参照）。この抗体によるPD-L1機能の阻害による効

果と同様の効果が、PD-1の機能あるいは産生を阻害することによって得られることが示唆された。これは、PD-1欠損マウスを用いた腫瘍移入モデルでは、移入腫瘍細胞の増殖が全く認められなかったからであり、PD-1の機能阻害あるいは産生阻害も有効な癌治療方法になることを示すものである（実施例5，図5参照）。本発明者らが実験的に示したこれら結果は、抗PD-L1抗体のみが既述の効果を呈することを示すものではなく、PD-1とPD-L1からの抑制性シグナルの誘導を阻害し得るいずれのものもほぼ同様の効果を呈することを証明するものである。そのような効果を有するものとして、抗PD-1阻害抗体、可溶化PD-1、可溶化PD-L1、PD-1拮抗物質、PD-L1拮抗物質、PD-1とPD-L1の相互作用を阻害する物質、PD-1産生阻害物質、PD-L1産生阻害物質、PD-1による細胞内抑制シグナル阻害物質などが挙げられる。

【0041】

本発明の薬剤の投与によって、その効果が期待される腫瘍細胞は、癌腫、扁平上皮癌（例えば、子宮頸管、喉、結膜、膣、口腔、皮膚、膀胱、舌、喉頭、食道）、腺癌（例えば、前立腺、小腸、子宮内膜、子宮頸管、大腸、肺、脾、食道、直腸、子宮、胃、乳房、卵巣）が挙げられる。さらに、肉腫（例えば筋原性肉腫）、白血病、神経腫、メラノーマ、リンパ腫なども含まれる。

【0042】

これら腫瘍細胞のうち、特にPD-L1を顕著に発現している腫瘍細胞に対してその効果が期待できる。PD-L1の発現を、外科的に切除した腫瘍塊あるいは体外に採取した病変部の腫瘍片をサンプルとする検査により同定することができた場合、本発明の薬剤の投与は、PD-L1を顕著に発現している腫瘍を有する患者に対する外科的処置後の治療として、効率的で有効な方法となる。

【0043】

癌に対する化学療法および放射線療法は、リンパ球の増殖を激しく減少させるという副作用が不可避である。本発明の薬剤の投与は、減少したリンパ球細胞を刺激、増殖させる効果を示すと共に、通常の化学療法に付随する激しい副作用を最小限に抑制することができる。同様なことが放射線療法にも言える。本発明の

薬剤との併用によって、化学療法剤の用量または照射放射線量を、通常使用される用量あるいは照射量から大幅に減少させることができる。

【0044】

本発明の薬剤は、既存の化学療法剤と併用、あるいは共に製剤化することができる。そのような化学療法剤として、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、その他免疫療法剤、その他の抗癌剤が挙げられる。さらに、患者のQOL回復のための癌治療補助剤である白血球（好中球）減少症治療薬、血小板減少症治療薬、制吐剤、癌性疼痛治療薬と併用あるいは共に製剤化ができる。

【0045】

本発明の薬剤は、その他の免疫賦活剤と併用、あるいは共に製剤化することができる。そのような免疫賦活剤としては、各種サイトカインや腫瘍抗原などが挙げられる。免疫反応を刺激するサイトカインとしては、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、インターフェロン- α 、 β 、 γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-12などが挙げられる。また、B7リガンド誘導体、抗CD3抗体および抗CD28抗体、抗CTLA-4抗体も免疫反応を高めることができる。

【0046】

腫瘍抗原の投与も、腫瘍細胞に対するTリンパ球細胞の特異的免疫反応を高めることができ、本発明の薬剤との併用によって、付加的あるいは相乗的な増強を与えることができる。腫瘍抗原は、遺伝子が明らかなものについては精製タンパク質として、また不明なものについては、腫瘍細胞自体の溶解物として調製することができる。

【0047】

腫瘍抗原の例として、悪性黒色腫のMAGE-1、MAGE-3由来のHLA-A1およびHLA-A2拘束ペプチドやMART-1、gp100などが挙げられる。また、乳癌や卵巣癌のHER2/neuペプチドや腺癌のMUC-1ペプチド、さらに、転移性癌のNY-ESO-1などが挙げられる。

【0048】

あるウイルスは、感染宿主の免疫防御から逃れるための1つの方法として、Tリンパ球細胞の共役抑制因子を利用していると考えられている (J. Exp. Med., Vol191, No.11, 1987-1997 (2000))。ウイルス感染の慢性化は、このようなウイルスのエスケープ機能に一部起因しており、本発明の薬剤の投与によってTリンパ球細胞のウイルスに対する免疫反応を高めることができると考えられる。

【0049】

本発明の薬剤の投与は、高い罹患率と早期の死亡を伴う慢性感染症であるヒト肝炎ウイルス (B型肝炎 (HBV) およびC型肝炎 (HCV)) やヒトレトロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス (HIV1 および HIV2)、ならびにT細胞白血病およびヒトTリンパ向性ウイルス (HTLV1 および HTLV2) の治療に有効である。また、単純ヘルペスウイルス (HSV) 1型および2型、エプスタイン・バーウイルス (EBV)、サイトメガロウイルス (CMV)、水痘-帯状疱疹ウイルス (VZV) およびヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) を含むヒトヘルペスウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、日本脳炎ウイルス、おたふくウイルス、インフルエンザウイルス、風邪ウイルスとして挙げられるアデノウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルスなどの感染の治療にも有効であると考えられる。

【0050】

その他の病原体 (例えば、病原性原生動物 (トリパノソーマ、マラリアおよびトキソプラズマ)、細菌 (マイコバクテリウム、サルモネラおよびリステリア) および真菌 (カンジダ)) による感染に対しても有効であると考えられる。

【0051】

本発明の薬剤は、既存の抗HIV剤、抗ウイルス剤、抗生物質製剤、抗菌剤、内臓真菌症治療薬と併用あるいは共に製剤化することができる。

【0052】

抗HIV剤としては、逆転写酵素阻害剤 (例えば、AZT, ddI, 3TC, dd4T) やプロテアーゼ阻害剤 (例えば、メシル酸サキナビル、リトナビル、メシル酸ネルフィナビル、アンブレナビル、メシル酸デラビルジン、サキナビル、ロピナビル/リトナビル)、CCR5受容体拮抗剤などが挙げられる。抗ウイル

ス剤としては、抗ヘルペスウイルス剤、抗インフルエンザウイルス剤、インターフェロン- α および β 、各種免疫グロブリンが挙げられる。

【0053】

本発明の薬剤は、ウイルスもしくは病原体のワクチンと併用あるいは共に製剤化することができる。そのようなワクチンとしては、ポリオワクチン、麻疹ワクチン、日本脳炎ワクチン、BCGワクチン、3種混合ワクチン、おたふくワクチン、水痘ワクチン、インフルエンザワクチン、A型肝炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、コレラワクチンが挙げられる。

【0054】

【医薬品への適用】

本発明の薬剤を上記の目的で用いるには、通常、全身的または局所的に、経口または非経口の形で投与される。

【0055】

投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人あたり、1回につき、 $1\mu\text{g}$ から $1000\mu\text{g}$ の範囲で、1日1回から数回経口投与されるか、または成人一人あたり、1回につき、 $1\mu\text{g}$ から $300\mu\text{g}$ の範囲で、1日1回から数回非経口投与（好ましくは、静脈内投与）されるか、または1日1時間から24時間の範囲で静脈内に持続投与される。

【0056】

もちろん前記したように、投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

【0057】

本発明の薬剤を投与する際には、経口投与のための内服用固形剤、内服用液剤、および非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等として用いられる。

【0058】

経口投与のための内服用固形剤には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセル剤には、ハードカプセルおよびソフトカプセルが含まれる。

【 0 0 5 9 】

このような内服用固形剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質がそのままか、または賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸等）等と混合され、常法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよいし、また2以上の層で被覆していてもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

【 0 0 6 0 】

経口投与のための内服用液剤は、薬剂的に許容される水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含む。このような液剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質が、一般的に用いられる希釈剤（精製水、エタノールまたはそれらの混液等）に溶解、懸濁または乳化される。さらにこの液剤は、湿潤剤、懸濁化剤、乳化剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤等を含有していてもよい。

【 0 0 6 1 】

非経口投与のための注射剤としては、溶液、懸濁液、乳濁液および用時溶剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤を包含する。注射剤は、ひとつまたはそれ以上の活性物質を溶剤に溶解、懸濁または乳化させて用いられる。溶剤として、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノールのようなアルコール類等およびそれらの組み合わせが用いられる。さらにこの注射剤は、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリソルベート80（登録商標）等）、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでいてもよい。これらは最終工程において滅菌するか無菌操作法によって製造、調製される。また無菌の固形剤、例えば凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無菌の注射用蒸留水または他の溶剤に溶解

して使用することもできる。

【0062】

非経口投与のための、その他の製剤としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、軟膏剤、塗布剤、吸入剤、スプレー剤、坐剤および腔内投与のためのペッサリー等が含まれる。

スプレー剤は、一般的に用いられる希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような緩衝剤、例えば塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば米国特許第2,868,691号および同第3,095,355号に詳しく記載されている。

【0063】

【発明の効果】

PD-1またはPD-L1の機能を阻害することを特徴とする薬剤に、癌もしくは慢性感染症に対する新たな治療効果を見出した。

【0064】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

【0065】

実施例1

マウスPD-L1発現ベクターの作製は、マウスPD-L1 cDNA (J Exp Med 2000 Oct 2 ; 192(7) : 1027-34) を制限酵素EcoRIで消化して、発現ベクターpApuroXS (EMBO. J, 13, 1341-1349, 1994) に挿入し、連結させることによって行った。作製した発現ベクターpApuroXS-PD-L1のP815細胞への導入は、エレクトロポレーション法(360V、500 μ F)で行った。P815細胞の培養は、FCS(10%)、2-メルカプトエタノール(10^{-5} M)、各種抗生物質含RPMI-1640培地で培養できるが、さらに、抗生物質ピューロマイシン(Puromycin; 3 μ g/ml)を含んだ培地の培養に対して耐性の同細胞株を継代培養することによって、マウスPD-L1

を安定的に発現する形質転換 P 8 1 5 細胞株を取得した。PD-L 1 の発現は、フローサイトメトリー解析にて確認した。図 1. A に H-2 L^d 特異的 2 C C T L クロンの PD-1 発現 (i) と、P 8 1 5 (肥満細胞種由来細胞株) の PD-L 1 発現安定形質転換株での PD-L 1 発現 (ii) を示すフローサイトメトリーを示す。

【0066】

同様の方法で、PD-L 1 を安定的に発現する形質転換 B 1 6 細胞株 (B 1 6 /PD-L 1) を取得した (図 1. A (iii) ~ (v) 参照)。ここでは発現ベクターとして同様の方法で作製した p E F B O S n e o -PD-L 1 (Nucleic Acids Res. 1990 Sep 11 ; 18(17) : 5322.) を使い、細胞株の選択培養には G 4 1 8 (0.5mg/ml) を使用した。

【0067】

全長マウス PD-L 1 cDNA の 3' 末端側に 6 個のヒスチジンがタンデムに並んだペプチドタグ (H i s -T a g) を連結させたタンパク質をコードする cDNA を制限酵素 E c o R I および N o t I で消化して、発現ベクター p V L 1 3 9 3 (商品名: Clontech より購入) に挿入させた。続いて、この発現ベクターを S F 9 昆虫細胞 (Invitrogen より購入) に導入して、封入体を回収した。この封入体ウイルスを H i F i v e 昆虫細胞 (Invitrogen より購入) に 2 日間、27℃ 下で培養することによって感染させた。溶解緩衝液 (Tris-HCl (50 mM, pH 7, 含 1% Triton X-100)、EDTA (10 mM)、NaCl (150 mM)、各種プロテアーゼ阻害剤) で溶解させた細胞溶解液を、N i -セファロースカラムクロマトグラフィーで処理することによって、抗原となる精製 PD-L 1 タンパク質を取得した。

【0068】

透析した同 PD-L 1 タンパク質を完全フロイントアジュバンドと共に 8 週令メス Whister ラット (SLC Japan より購入) に免疫して、数日後、末梢リンパ節から回収した 2×10^8 細胞を、PEG 1500 (Amersham より購入) を用いて同数の SP 2 / 0 細胞と細胞融合させた。さらに、RPMI 1640 培地 (HAT (Sigma より購入)、Origen (10%, Igen より購入)、FCS (10%)、2

ーメルカプトエタノール (10^{-5}M)、各種抗生物質) で培養することによって選択し、産生抗体の存在をフローサイトメトリー解析にて確認した。これによって樹立されたハイブリドーマ (識別のための表示: 1-111、受託番号: FERM P-18908) を Balb/C nu/nu マウスに移入して、後に腹水からの回収液をプロテイン G セファロース カラム クロマトグラフィーで精製することによって、PD-L1 に対するモノクローナル抗体 1-111A を取得した。フローサイトメトリー等で使用される抗体は、sulfo-NHS-LC-biotin (商品名: Pierce より購入) を用いてビオチン化したものを用いた。

【0069】

細胞傷害性アッセイは、 ^{51}Cr (クロム) 遊離アッセイによって行った。

2C細胞 (J. Immunol, 157, 670-678, 1996) は、2Cトランスジェニック B6 マウス由来の (H-2L)^d アロ反応性の細胞傷害性 T 細胞である。2C細胞 (E: エフェクター) を ^{51}Cr ラベル化した P815 細胞 (T: ターゲット) と共に (O) または 3 つの PD-L1 発現 P815 細胞株 (P815/PD-L1) (□、◇、△) と共にあるいはさらに 10mg/ml ラット anti-PD-L1 F (a b')₂ IgG 存在下 (■) を、さまざまな E/T 比で混合して、4 時間で遊離される ^{51}Cr を測定した。それらの結果を図 1. B に示す。

【0070】

抗 PD-L1 抗体 (anti-PD-L1 F (a b')₂) は、細胞傷害性 T リンパ球細胞の低下した細胞傷害活性を回復させた。これらの結果から、PD-L1 の機能を阻害することによる PD-1 および PD-L1 シグナルの阻害は、癌細胞に対する細胞傷害活性を増強させることができると考えられる。

【0071】

実施例 2

1×10^6 細胞の P815 細胞 ($n=5$) または P815/PD-L1 細胞 ($n=6$) を同系 DBA/2 マウスの皮下にそれぞれ移入し、腫瘍増殖とマウスの生存率を評価した。その結果を図 2. A に示す。図中、O は P815 細胞移植群、□、△ は PD-L1 発現 P815 細胞株移植群である。さらに P815/PD-L1 細胞を移入した群の組織学的解析を行った。移入 20 後のマウスの腹壁な

らびに腹膜腔の組織切片を、10%ホルムアルデヒドで固定、パラフィンで砲架して、ヘマトキシリン、エオジンで染色して得られた染色像を図2. Bに示す。aは腹壁および腹膜への腫瘍細胞の浸潤を示す40倍像、bは同じく400倍像であり、cは脾臓への転移、dは肝臓への転移を示す。

【0072】

P815細胞を移植した群では、P815細胞の増殖は抑えられており、6～7週目では30%が生存したのに対して、PD-L1を発現するP815細胞（P815/PD-L1）を移植した群では、癌細胞の増殖は著しく、2～4週目までに全例が死亡した（図2. A）。P815/PD-L1は、腹膜腔、さらに、腹腔へ浸潤しており、また、肝および脾臓への転移が認められた（図2. Ba～d参照）。

【0073】

実施例3

P815細胞を移入し免疫したマウスから細胞傷害性T細胞CTLを調整し、 2×10^6 個数のCTL細胞と、 5×10^6 個数のP185細胞またはP815/PD-L1細胞のみあるいはanti-PD-L1 F(ab')₂ IgG (10mg/ml) 存在下でP815/PD-L1細胞をそれぞれ混合培養し、24時間後の培養上清中のIFN- γ をELISAキット（Bioscienceから購入）で測定した。その結果を図3. Aに示す。

また、図3. Bに、 3×10^6 個数のP815/PD-L1細胞を皮下移入した同系DBA/2マウス（n=10）に、ラットIgG（○）あるいはanti-PD-L1 F(ab')₂ IgG (0.1mg/一匹)（□）を、細胞移入後1、3、5、7日後にそれぞれ腹腔内投与し、腫瘍増殖とマウスの生存率を評価した結果を示す。

抗PD-L1抗体は、P815/PD-L1により抑制された細胞傷害性Tリンパ球細胞からのIFN- γ 産生を回復させた（図3. A）。抗PD-L1抗体の投与は、癌細胞増殖を抑制し、明確な生存効果を示した（図3. B）。この結果は、抗PD-L1抗体の投与が癌治療に有効であることを示している。

【0074】

実施例 4

1×10^6 個数の B16 メラノーマ ($n=6$) または B16/PD-L1 細胞 ($n=9$) を B6 マウスにはそれぞれ皮下移入し、同数の B16/PD-L1 細胞を PD-1 トランスジェニック B6 マウス ($n=5$) および PD-1 ホモ欠損 B6 マウス ($n=5$) (Science. 2001 Jan 12 ; 291(5502) : 319-22.) に移入し、以後 25 日までそれぞれの腫瘍増殖を測定した。その結果を図 4 に示す。

【0.075】

実施例 5

2.5×10^8 個数の J558L ミエローマ細胞を皮下移入した同系 Balb/C マウス ($n=9$) に、ラット IgG あるいは anti-PD-L1 F(ab')₂ IgG (0.1mg/一匹) を細胞移入後 3、5、7 日後にそれぞれ腹腔内投与し、腫瘍増殖を評価した (図 5. B)。また、同様に J558L ミエローマ細胞を皮下移入した PD-1 ホモ欠損マウス (PD-1^{-/-}, $n=4$) (Science. 2001 Jan 12 ; 291(5502) : 319-22.) と Balb/C ($n=4$) での腫瘍増殖を比較した (図 5. C)。

抗 PD-L1 抗体の投与は、PD-L1 を発現している J558 癌細胞 (図 5. A に各種ミエローマ細胞株での PD-L1 発現を示すフローサイトメトリーを示す。) の増殖を抑制した (図 5. B)。また、J558 細胞を移植した PD-1 欠損マウスでは移植癌細胞の増殖は完全に阻害された (図 5. C)。これらの結果は、PD-L1 もしくは PD-1 の阻害が癌治療に有効であることを示している。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 A は H-2L^d 特異的 2C CTL クローンの PD-1 発現と、P815 (肥満細胞種由来細胞株) の PD-L1 発現安定形質転換株での PD-L1 発現を示すフローサイトメトリー、B は PD-L1 発現 P815 細胞株に対する 2C CTL 細胞株の細胞傷害活性と抗 PD-L1 抗体 (anti-PD-L1 F(ab')₂ IgG) の細胞傷害活性に対する効果を示す。

【図 2】 同系マウスにおける移植 PD-L1 発現 P815 細胞株の腫瘍増殖性と浸潤性を示す。A は移植 PD-L1 発現 P815 腫瘍の腫瘍容積 (左)、

移植後の生存率（右）であり、Bは同系DBA/2マウスにおける移植PD-L1発現P815腫瘍塊の組織染色像である（aは腹壁および腹膜への腫瘍細胞の浸潤を示す40倍像、bは同じく400倍像、cは脾臓への転移、dは肝臓への転移を示す。）。

【図3】 同系マウスにおける移植PD-L1発現P815細胞株の腫瘍増殖性に対する抗PD-L1抗体のin vivo効果を示す。Aは当該マウスにおける腫瘍特異的CD8+T細胞からのIFN- γ 産生に対する抗PD-L1抗体のin vivo効果、Bは当該マウスにおける移植PD-L1発現P815腫瘍の腫瘍容積（左）と生存率（右）に対する抗PD-L1抗体のin vivo効果を示す（図中、○は対照群（ラットIgG投与群）、□は抗PD-L1抗体（anti-PD-L1 F(ab')₂ IgG）投与群）。

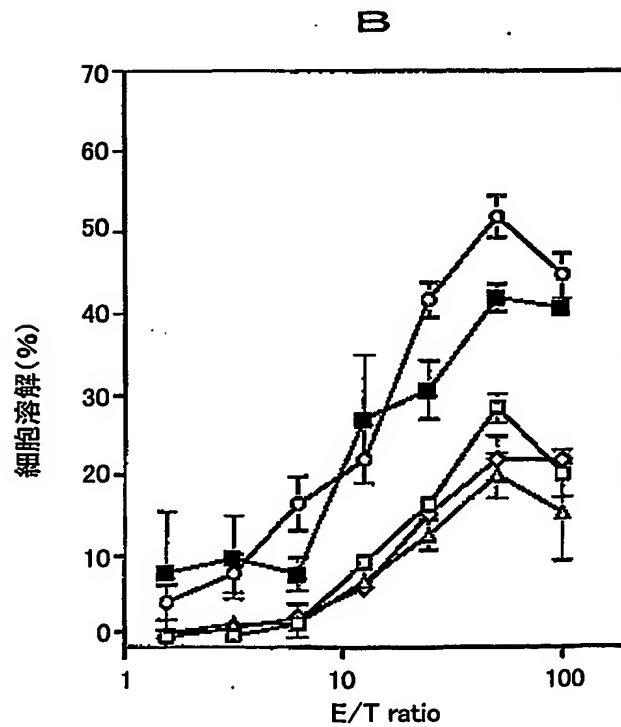
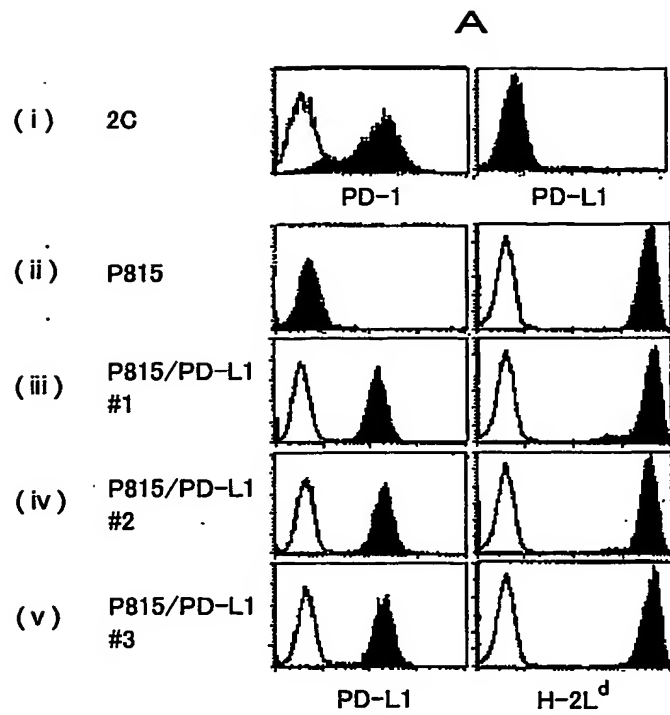
【図4】 同系PD-1欠損マウスでのPD-L1発現B16メラノーマの増殖抑制を示す。

【図5】 同系マウス（BALB/c）における移植ミエローマ細胞株の腫瘍増殖性に対する抗PD-L1抗体のin vivo効果とPD-1の関与を示す。Aは各種ミエローマ細胞株でのPD-L1発現を示すフローサイトメトリー、Bは前記マウスにおける移植J558L腫瘍の腫瘍容積に対する抗PD-L1抗体のin vivo効果、Cは野生型およびPD-1欠損同系マウスにおける移植J558L腫瘍の腫瘍増殖の比較を示す。

【書類名】

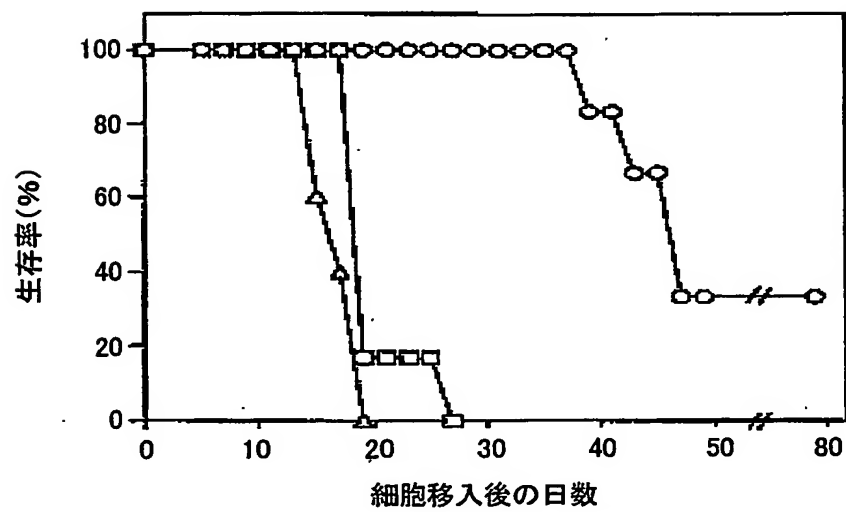
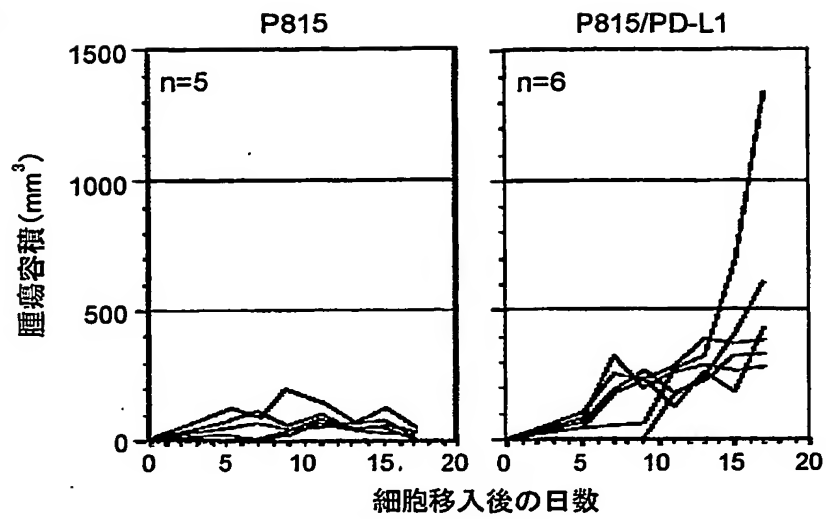
図面

【図1】

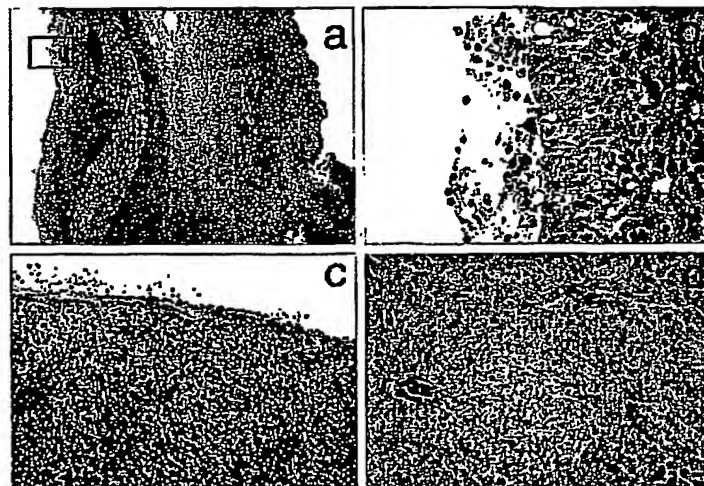


【図2】

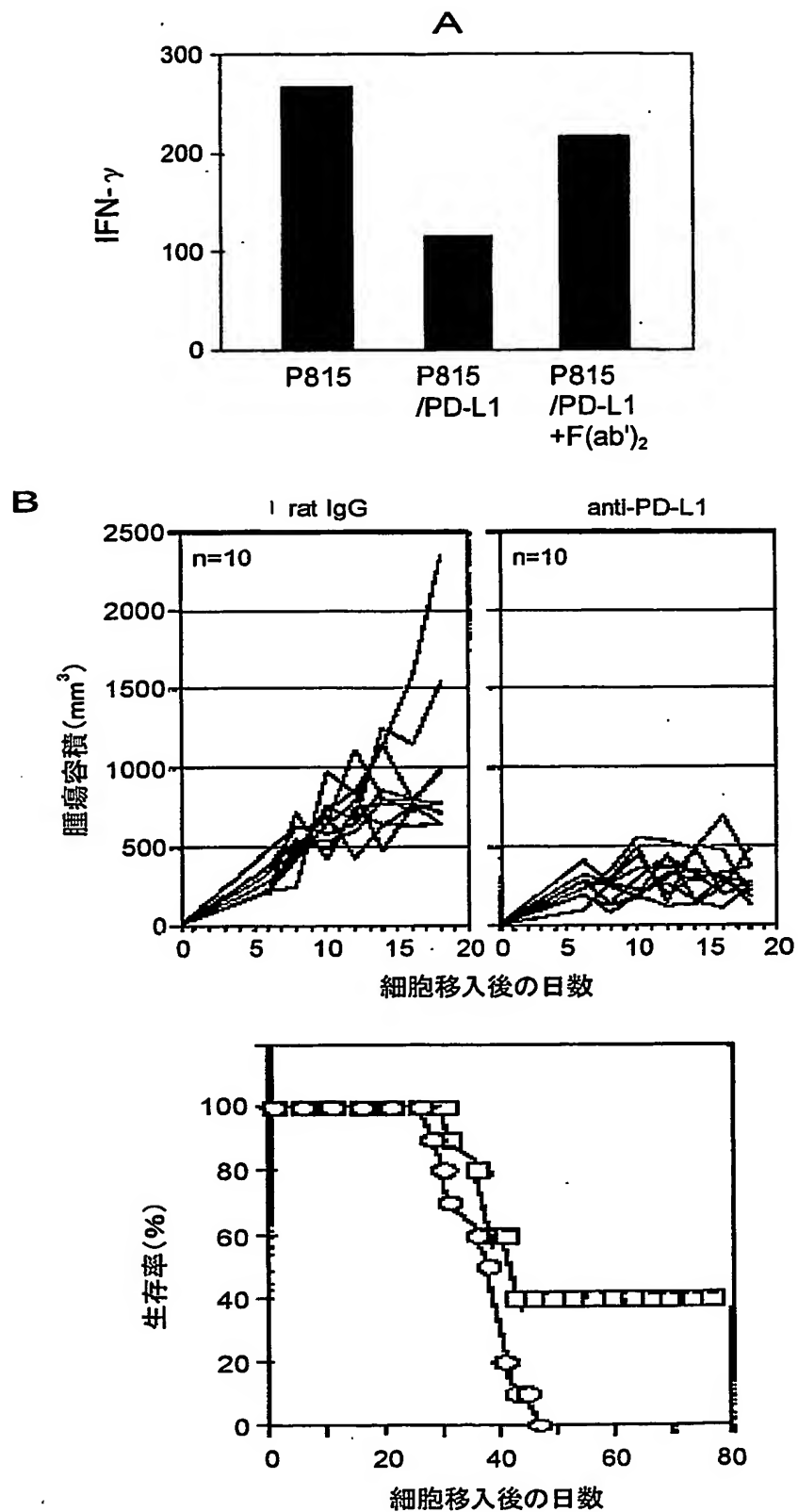
A



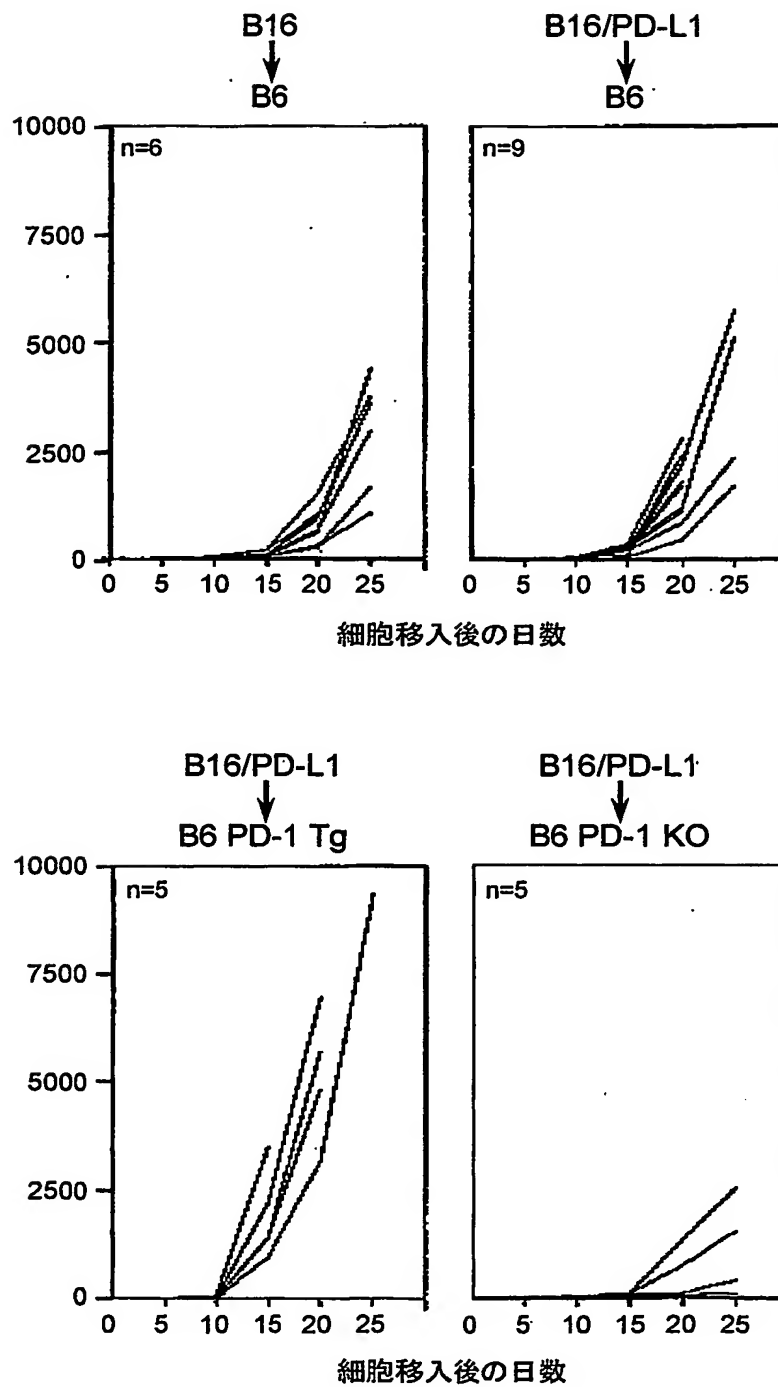
B



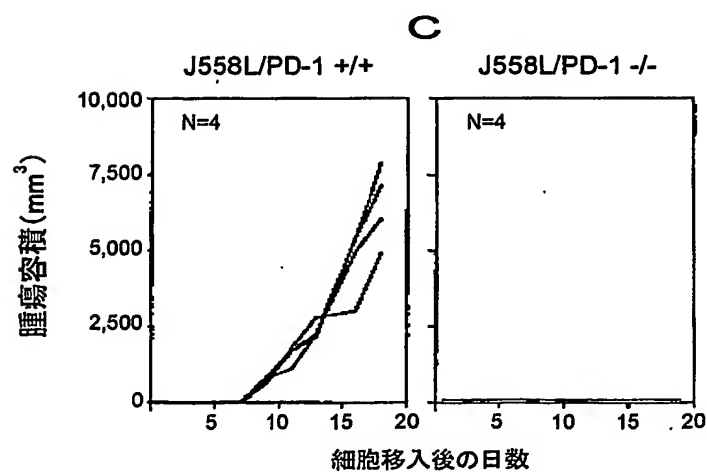
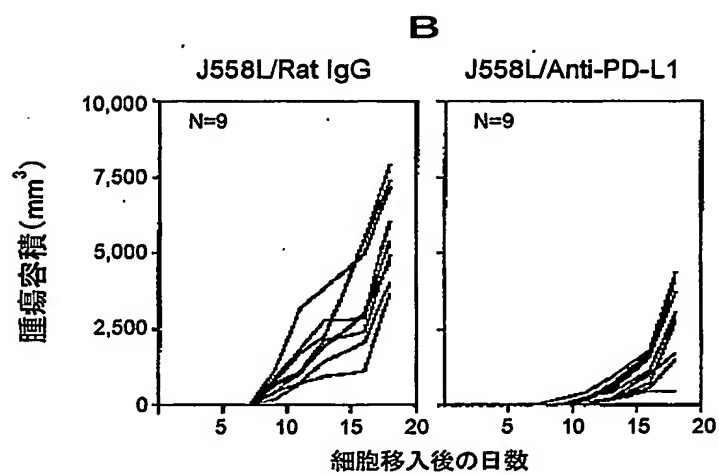
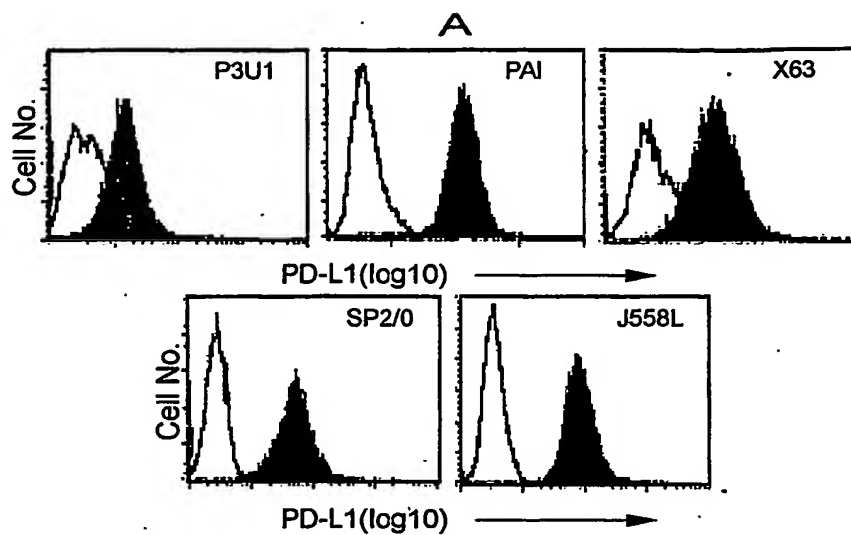
【図 3】



【図4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 P D - 1 または P D - L 1 によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害することを特徴とする免疫賦活剤、その免疫賦活剤を有効成分とする免疫療法剤、感染症治療剤、インビトロスクリーニング方法、腫瘍細胞株、癌の治療剤を選別するインビボ評価法、その評価に用いられる腫瘍移植マウス、癌治療のための医薬組成物、感染症治療のための医薬組成物、および免疫反応を活性化させたリンパ球細胞。

【効果】 P D - 1 または P D - L 1 の機能を阻害する本発明による免疫賦活剤は、癌もしくは慢性感染症に対する治療に有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000185983]

1. 変更年月日 1990年 9月 2日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号

氏 名 小野薬品工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396023812]

1. 変更年月日	1998年 1月22日
[変更理由]	住所変更
住 所	京都府京都市左京区岩倉大鷲町19-4
氏 名	本 庶 佑